#### 世界知的所有権機關

# **PCT**

#### 国際事務局



### 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6

C12N 15/87, 5/10, C07K 14/78

(11) 国際公開番号

WO96/17073

(43) 国際公開日

1996年6月6日(06.06.96)

(21) 国際出願番号

PCT/JP95/02425

A1

(22) 国際出頭日

1995年11月29日(29.11.95)

(30) 優先権データ

特顧平6/317721

1994年11月29日(29.11.94)

(71) 出順人(米国を除くすべての指定国について)

實曆造株式会社

(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP]

〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出順人(米国についてのみ)

福野仁一(HASHINO, Kimikazu)[JP/JP]

〒569.大阪府高槻市明野町27-3 Osaka, (JP)

松下秀之(MATSUSHITA, Hideyaki)[JP/JP]

〒525 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1

ハーモパレス草準401号 Shiga, (JP)

加廉郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP]

〒611 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)

(74) 代理人

弁理士 青山 葆,外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)

(81) 指定国

AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許( KE, LS, MW, SD, SZ, UG).

添付公開書類

国際調査報告書

(54) Tide: PROCESS FOR PRODUCING TRANSFORMED CELL

(54) 発明の名称 形質転換細胞の製造方法

(57) Abstract

A process for producing transformed cells by introducing foreign genes into target cells through piercing, which comprises the step of culturing the target cells having the foreign genes injected thereinto in the presence of a cell adhesion-active substance; and a kit for producing transformed cells suitable for use in the above method and containing as the essential ingredients the cells to be transformed with foreing genes by this method and a cell adhesion-active substance.

# (57) 要約

穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し、形質転換細胞を製造するに際し、標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含する外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法、該方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞および細胞接着活性物質を必須の構成成分とする該方法で使用するに適した形質転換細胞製造用キットを開示する。

	情報としての用途のみ	Thing 相を励をするために使用され	<b>,</b> るコード
マトインンンリジアシガルスリーア・ を デエスフフガイグギギハアアイBケキ朝大カリー	LRSTUVCDMMDGK LLLLUVCDMMDGK LNRWMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM	PTOUDEGING TTT TTUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	ルロス・アンス 大 ・

0.1

### 明細書

### 形質転換細胞の製造方法

#### 技術分野

本発明は、形質転換細胞の製造方法、さらに詳しくは、細胞工学、遺伝子工学、発生工学などの分野において標的細胞への外来遺伝子導入を効率 良く行うことを可能にする方法に関する。

#### 背景技術

標的細胞内への外来遺伝子導入方法には、リン酸カルシウム法、DEA Eーデキストラン法、リボソーム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などが知られている。いずれの方法も操作法、効率、細胞に対するダメージなどの点で一長一短がある。中でもエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等の穿孔法は、特別な試薬を用いることなく細胞の取扱いが可能であり、導入効率も良好である。しかしながら、穿孔による細胞のダメージは免れない。

本発明の目的は、穿孔法により標的細胞内へ外来遺伝子を導入して形質 転換細胞を製造する際の、導入効率を向上させる方法を提供することにある。さらに、該方法に用いるキットを提供することも目的とする。

#### 発明の概要

本発明の第1の発明は形質転換細胞の製造方法に関する発明であって、 穿孔法を用いて形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標 的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質 : 1

の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第2の発明は、本発明の製造方法で製造される外来遺伝子による形質転換細胞に関する発明である。

また、本発明の第3の発明は、形質転換細胞製造用キットに関する発明であって、上記第1の発明の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする。

# 発明の詳細な説明

本発明の方法は、穿孔法を用いて標的細胞に外来遺伝子を導入した後に、細胞接着活性を有する物質の存在下この細胞を培養することを特徴とする。

本発明において穿孔法とは、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等であり、細胞壁の穿孔により、遺伝子を注入する方法である。エレクトロポレーション法とは、例えば、蛋白質、核酸、酵素、第31巻、第1591~1603頁(1986)に記載の方法であり、マイクロインジェクション法とは、例えば、セル(Cell)、第22巻、第479~488頁(1980)に記載の方法であり、パーティクルガン法とは、例えば、テクニーク(Technique)、第3巻、第3~16頁(1991)に記載の方法であり、細胞に遺伝子を導入する方法として使用する公知の方法を包含する。

これらの穿孔法で使用される細胞としては、例えば、動物細胞を公知 [日本生化学会編: "新生化学実験講座18 細胞培養技術"、(第1版) (1990)東京化学同人発行]の方法で調製すれば良く、また、培養動 物細胞を使用しても良い。

細胞接着活性物質とは、細胞接着活性、すなわち標的細胞を細胞、あるいは組織内にある細胞間を満たす物質である細胞外マトリックス、またプラスチックやガラスなどの器質に接着させる活性を有する物質をいい、本

発明においては、標的細胞の形質転換に悪影響を及ぼさない限り、いずれの該活性を有する物質も使用できる。かかる活性とは、細胞をその形態を保持して、あるいは伸展、すなわち一またはそれ以上の方向に細胞が伸び、その形態が変化した状態で、例えば細胞接着活性物質を被覆した培養器具に固定する活性である。

細胞接着活性物質と標的細胞の結合は慣用の方法を使用して同様にアッセイすることができる。例えば、このような方法にはネイチャー(Nature)、352:438~441 (1991年) に記載された方法が含まれる。簡単に言えば、細胞接着活性物質はプラスチック皿上を被覆しており、そしてアッセイすべき細胞集団は培地に重層して30分から2時間置く。このインキュベーション期間後に、接着していない細胞を回収し、計数しそして生存性についてアッセイする。細胞接着活性物質と接着した細胞もトリプシンまたは細胞解離緩衝液(例えば、Gibco)を使用して回収し、計数しそして生存性を試験する。次に、接着細胞の割合を計算しそしてウシ血精アルブミン(BSA)被覆ブラスチック皿のような標準乃至標準対照と比較する。標的細胞とアッセイした細胞接着活性物質の実質的な接着によって、細胞接着活性物質/細胞の組合せを決定できる。または細胞伸展活性は、上記操作中、接着した細胞をトリプシンまたは細胞解離緩衝液を用いて解離させる前にその形態変化を顕微鏡下で観察することによって測定することができる。

細胞接着活性物質としては、例えば、細胞接着活性ポリペプチドまたは 該ポリペプチドの機能的同等物や細胞接着合成ポリマーが挙げられる。

本発明に使用する細胞接着活性を有するポリペプチドとしては、例えば、インベイシン、ポリリジン等の細胞外マトリックス由来以外の細胞接着活性ポリペプチド、例えば、特開平2-311498号公報に記載の細胞伸

展活性を示すポリペプチド、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラ ーゲン、ビトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、テネ イシン等の細胞外マトリックスの構成成分等がある。細胞外マトリックス 構成成分は公知の方法 [インターナショナル ジャーナル オブ キャン サー(International Journal of Cancer)、第20巻、第1~5頁(19 77)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第254卷、第9933~9937頁(197 9) 、日本生化学会編: "続生化学実験講座 第6巻 細胞骨格の構造と 機能(下) 、(第1版)(1986)東京化学同人発行、セル ストラ クチャー アンド ファンクション (Cell Structure and Function)、第 13巻、第281~292頁(1988)、ジャーナル オブ バイオロ ジカル ケミストリー、第264巻、第18202~18208頁(19 89)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第260巻、 第12240~12245頁(1985)]で、天然物、培養物より調製 することができる。細胞接着活性ポリペプチドとしては、実質的に純化さ れた細胞接着活性を示す細胞外マトリックス、実質的に純化された細胞外 マトリックスフラグメントまたはそれらの混合物でも良く、細胞接着活性、 細胞伸展活性を有するタンパク質、ポリペプチドおよびその機能的同等物 を使用することができる。

これらの細胞接着活性ポリペプチドは、実質的に純化された天然物を使用しても良く、その酵素学的、化学的分解物、またこれらの物質を遺伝子工学的に作成したものを使用しても良い。さらに、これらの物質の機能、すなわち細胞接着活性、細胞伸展活性を損なうことなく改変した物も使用することができる。なお本発明において、天然起源のポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸が欠失、置換、付加および/または挿入のいずれか一

つがなされていても所望の細胞接着活性、細胞伸展活性を有するボリペプチドを天然アミノ酸配列を有するボリペプチドの機能的同等物という。すなわち、天然に存在するタンパク質にはそれをコードする遺伝子の多形や変異によりアミノ酸配列に変化が生じたものの他に、生成後のタンパク質の生体内および精製中の修飾反応などによって、そのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こったものも含まれるが、それにも関わらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に差異があっても、その主要な機能を共通にしていると認められるものを機能的に同等の活性を有するポリペプチドと呼ぶ。

人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合でも同様であり、この場合はさらに多種多様の変異体を作製することが可能であるが、変異を有しないものと実質的に同等の生理活性を示す限り、これらの変異体は機能的に同等の活性を有するポリペプチドと解釈される。たとえば、大腸菌で発現されたタンパク質のN末端に存在するメチオニン残基は、多くの場合、メチオニンアミノペプチダーゼの作用により除去されるとされているが、タンパク質の種類によってはメチオニン残基を持つもの、持たないものの両方が生成される。しかしながら、このメチオニン残基の有無はタンパク質の活性に影響を与えない場合が多い。また、ヒトインターロイキン2(IL-2)のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている[サイエンス(Science)、第224巻、1431頁(1984)]。

さらに、遺伝子工学的にタンパク質の生産を行う際には、融合タンパク質として発現させることがしばしば行われる。たとえば、目的のタンパク

質の発現量を増加させるために、目的のタンパク質のN末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的のタンパク質のN末端、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、この付加したペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより、目的のタンパク質の精製を容易にすることなどが行われている。

この点に関して、関連バイオテクノロジー技術は、対象の機能的領域中のアミノ酸の欠失、置換、付加または他の修飾を定型的に実施することができる状態にまで進歩している。次に、得られたアミノ酸配列は所望の細胞接着活性または細胞伸展活性について、上記の方法により定型的にスクリーニングすることができる。

細胞接着活性を有するポリペプチドは、分子内に細胞接着活性に必要なアミノ酸配列、例えば、配列表の配列番号1(RGDS)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号2(CS1)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号6(ラミニンの中心配列、YIGSR)で表されるアミノ酸配列より選択されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドでも良く、これらのポリペプチドは遺伝子工学的方法、化学合成方法で大量に調製でき、純化されたポリペプチドとして使用することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平1-180900号公報に記載の配列表の配列番号7で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは、Escherichia coli HB101/pTF1409 (FERM BP-1939)を用いて該公報に記載の方法により調製することができる。また、下記表1に示す各配列表の配列番号で表されるポリペプチドも、各公報記載の遺伝子工学的方法により調製することができる。

なお、表1中の Escherichia coli HB101/pCHV90が含有す

るプラスミド HB101/pCHV90は、Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) および Escherichia coli JM109/pTF7021 (FERM BP-1941) を用い、特開平5-271291号公報記載の方法により調製することができる。

## 表1

				•
	公開公報	配列表の	生産菌	寄託番号
		配列番号	(Escherichia coli)	
		•		
	特開平1-206998号	配列番号8	JM109/pTF7021	FERM BP-1941
	特開平1-261398号	配列番号9	HB101/pTF1801	FERM P-9948
	特開平2-97397号	配列番号3	JN109/pTF7221	FERM BP-1915
	特開平2-152990号	配列番号10	JM109/pTFB800	FERM BP-2126
	特開平2-311498号	配列番号11	HB101/pCH101	FERM BP-2799
	<b>特開平3-59000号</b>	配列番号12	JN109/pCF406	FERM P-10837
	特開平3-232898号	配列番号13	HB101/pCE102	FERM P-11226
•	特開平4-54199号	配列番号14	JM109/pTF7520	FERM P-11526
			+VN-IN. TAA	•
		配列番号15	JM109/pTF7520	
			+Col <sup>x</sup> 1	FERM P-11527
	特開平5-271291号	配列番号16	HB101/pCHV179	FERM P-12183
		配列番号17	HB101/pCHV90	: <u>-</u>
. •	·	配列番号18	HB101/pCHV89	FERM P-12182
	特開平5- 97698号	配列番号19	J <b>M</b> 109/pTF7520Co1V	FERM BP-5277
•	特開平5-178897号	配列番号20	JM109/pYMH-CF - A	FERM BP-5278
	•		•	

また、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドは化学合成することもでき、例えば、特開平3-173828号公報に記載のポリRGDSを合成、使用しても良い。

分子内に配列表の配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平 2-311498 号公報に記載の配列表の配列番号 4 で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB 101/p HD 102 (FERM P-10721)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平 3-284700 号公報に記載の方法に従い、配列表の配列番号 2 で表されるポリペプチドを化学合成しても良い。

対表の配列番号3で表されるアミノ酸配列を含有する人工のボリペプチドとしては、例えば、特開平2-311498号公報に記載の配列表の配列番号21で表されるボリペプチドがあり、該ボリペプチドは Escherichia coli HB101/pCH102(FERM BP-2800)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平3-284700号公報に記載の配列表の配列番号5で表されるポリペプチドも分子内に配列表の配列番号1、2のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB101/pCS25(FERM P-11339)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製できる。

以上のように、本発明に使用するポリペプチドの例としては、分子内に 配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列 番号2で表されるアミノ酸配列を含有する細胞接着活性ポリペプチドがあ り、該ポリペプチドとしては、例えば、ヒト・フィブロネクチンの細胞接 着ドメイン [モッシャー, D. F. (Mosher, D. F.) 編: "フィブロネクチン" (Fibronectin)、第47~121頁(1989)アカデミックプレス (Academic Press)発行]由来ポリペプチドと同CS1ポリペプチド(同上刊行物)が共有結合したもの、CS1ポリペプチドを含有するヘパリン結合ドメイン(同上刊行物)由来ポリペプチド、あるいは細胞接着由来ポリペプチドを使用することができ、これらはそれぞれ遺伝子工学的に作製することができる。例えば、細胞接着ドメイン由来ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクターから、それぞれ必要な領域を取出し、単独あるいは組合せて使用することにより、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドが共有結合したポリペプチドを作製する場合、ポリペプチド間の共有結合は、直接結合であってもよく、間接結合、例えば、スペーサーを介した間接結合であってもよい。スペーサーは、各領域の分子間距離を調節するための挿入配列であり、任意のペプチド鎖を用いることができ、例えば、フィブロネクチン分子中のCS1領域の上流配列であってもよい。スペーサー配列は遺伝子工学的に容易に導入することができる。

細胞接着合成ポリマーとしては、例えば、公知のポリーNーpービニルベンジルーDーラクトンアミド(PVLA)が挙げられる。

本発明において、標的細胞は特に限定するものではないが、例えば、造

血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞等が 挙げられる。

外来遺伝子も、特に限定するものではなく、例えば、タンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸が挙げられ、本発明においては、外来遺伝子はベクターに組み込まれていてもよい。

ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルス ベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等が 挙げられる。

本発明によれば、常法に従って穿孔法によって外来遺伝子を導入した標的細胞を、細胞接着活性物質の存在下で培養することにより、該遺伝子が導入された形質転換細胞を効率よく得ることができる。細胞培養方法としては使用する細胞により、公知の方法から選択すれば良い。例えば細胞接着活性ポリペプチドの存在下で細胞培養を行う場合、培養液中に $250\sim2000~\mu~g/m$ 1 の細胞接着活性ポリペプチドを含有させ、常法に従い培養すれば良い。

特に、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養するのが好ましい。培養器具とは、通常に細胞を培養する目的に使用する器具であれば良く、例えば、培養皿、マイクロキャリアー使用の培養器具、繊維状の中空糸使用の培養器具である。培養器具への該物質の被覆方法としては塗布しても良く、散布しても良い。例えば、細胞接着活性ポリペプチドの培養器具への被覆は容易に行うことができ、該ポリペプチドを例えばリン酸緩衝生理食塩水(PBS)のような適当な溶液に溶かし、培養器具に添加し、適当時間静置することで培養器具にポリペプチドを被覆できる。培養器具

に被覆するポリペプチド量としては $50\sim1000\,\mathrm{pmol/cm^2}$ の範囲、好適には $150\sim600\,\mathrm{pmol}$ の範囲より選択すれば良い。

細胞接着活性物質の存在下で培養した形質転換細胞は培養物中より常法により得ることができ、形質転換細胞を効率よく製造することができる。

得られた形質転換細胞は、細胞の遺伝子組換え技術を用いる有用物質の 生産、疾患モデルの開発、遺伝子治療等に有用であり、本発明により、効 率よく形質転換細胞が提供される。

また、細胞接着活性物質を含有するキットを使用することにより、本発明を簡便に行うことができる。キット中に含有される細胞接着活性物質は溶液でも良く、凍結乾燥品でも良い。キット中には細胞接着活性物質の溶解、希釈用緩衝液、細胞培養培地、細胞培養器具等を含有させても良い。例えば本発明の方法に用いるポリペプチド類、ポリペプチド希釈用PBS、培養器具等をまとめてキットとしておくことにより、簡便に、形質転換細胞の製造を行うことができる。キットに含める試薬は、溶液状でも凍結乾燥物でもよい。

なお、本発明で使用する穿孔法としての、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等は、目的に応じて適 宜選択、使用できる。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3で表されるポリペプチド(以下C274と称す)、 配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(以下H296と称す)およ び配列表の配列番号5で表されるポリペプチド(以下C・CS1と称す) をそれぞれ $1\mu$ Mとなるようにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶かし、 $0.22\mu$ mのフィルター (マイレクスーGV、ミリポア社) を用いて滅 菌した。

これらの溶液をそれぞれ 24 穴のポリスチレン製培養皿(コーニング社製)に 1m1 / ウエルとなるように添加し、4  $\mathbb C$  、一晩コートした。この培養皿は、以下に記載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地  $500\mu1$  / ウエルでリンスした。

#### 2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したヒト 類表皮癌A-431細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ1 0mlのウシ胎児血清を含まないダルペッコ改変最少基本培地でリンスし た後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを 3m1添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7m1の ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800 rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児 血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心 して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、10m1のPBSに懸濁し、 その10分の3量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遺 心して細胞を集めた。得られた細胞を再度、10mlのPBSに懸濁し、 800 r pm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌 的に調製されたpCAT-コントロール (control)ベクター (プロメガ社) 15μgを含む1m1のPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(パイオラッ ド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置 した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー (バイオラッド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中

で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960 $\mu$ Fで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15m1の10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24次のポリスチレン製培養皿に1m1/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37 $^{\circ}$ で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1m1/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37 $^{\circ}$ で一晩培養した。

#### 3. 形質転換効率 (遺伝子導入効率) の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25mlのPBSで3回リンスし、CAT-ELISAキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405nm/490nmを測定し、エレクトロポレーションの際、pCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のpCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。

この結果を図1に示す。すなわち、図1は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効率が示されている。

図1に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCAT-コントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

#### 実施例2

# 1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3で表されるポリペプチド(以下C274と称す)、配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(以下H296と称す)および配列表の配列番号5で表されるポリペプチド(以下 $C \cdot CS1$ と称す)をそれぞれ $1\mu$ Mとなるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶かし、 $0.22\mu$ mのフィルター(マイレクスーGV、ミリポア社)を用いて滅菌した。これらの溶液をそれぞれ24穴のポリスチレン製培養皿(コーニング社製)に1m1/ウエルとなるように添加し、4 $\infty$ 、一晩コートした。この培養皿は、以下に記載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地 $500\mu1$ /ウエルでリンスした。

#### 2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したアフリカミドリザル腎COS-7細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ10mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスした後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを3ml添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、12mlのPBSに懸濁し、その6分の5量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、その6分の5量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌的に調製されたpCAT-コントロール (control)ベクター(プロメガ社)

15μgを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(パイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(パイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960μFで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15mlの10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1ml/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1ml/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

#### 3. 形質転換効率 (遺伝子導入効率) の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25mlのPBSで3回リンスし、CAT-ELISAキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405nm/490nmを測定し、エレクトロポレーションの際、pCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のpCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。この結果を図2に示す。すなわち、図2は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効

PCT/JP95/02425

率が示されている。

図2に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCATーコントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

#### 実施例3

キットの作製

下記表2に示すようにC274、H296、 $C \cdot CS1$ 、PBSおよび 培養皿で遺伝子導入細胞製造用キットを作製した。このうち、試薬A、B、 Cはそれぞれ上記のボリペプチドをPBSにて表に示す濃度としたものを 調製した。その他は、実施例1に記載のものを使用した。なお、表2に示すキットの試薬A、B、Cおよび試薬希釈液は、いずれも $0.22\mu mo$  滅菌フィルターで予めろ過したものを用いて、無菌的に調製した。

### 表2

## 形質転換細胞製造用キット

試薬A・・・100μM	C 2 7 4	150μ1
試薬B・・・100μM	Н 2 9 6	150μ1
試薬C・・・100 μM	C · C S 1	150 µ l
試薬希釈液・・・PBS		45 m l
24穴ポリスチレン製培養	m	3枚

以上記載したごとく、本発明によれば、細胞への遺伝子導入を目的とする従来法の問題点を解決し、標的細胞への外来遺伝子導入効率を向上させた形質転換細胞製造方法が提供できる。また、該方法に使用する形質転換細胞製造用のキットも提供することができる。

### 図面の簡単な説明

図1は、ヒト類表皮癌A-431細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

図2は、アフリカミドリザル腎COS-7細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

配列番号:1

配列の長さ:4

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Arg Gly Asp Ser

1

配列番号:2

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

10

15

1 5

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20 25

配列番号:3

配列の長さ:274

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

Pró	Thr	Asp	Leu	λrg	Phe	Thr	λsn	lle	Çly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10	•				15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	i i e	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	G I u	Glu.	Asp	Val	Ala	.G I u	Leu
				35			•		40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Va!	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va l	Val	Ser	Va I	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	·Pro	Leu	λŗg	C 1 y	Arg	Gln	Lys	Thr	Ġly	Leu	Asp.
		,		80			•		85		-			90
Ser	Pro	Thr	Gly	lie	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	λla	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115				•	120
Ιle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125	•				130					135
Arg	, Val	Pro	His	Ser	Arg	Asr	ı. Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140	).		•		145					150
Pro	Gly	Thi	r Glu	ј Туп	· Val	l Va	l Ser	lle	. Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155	5				160	) <sub>.</sub>			•	165

Glu	G I	U	Ser	Pro	Leu	Leu	He	Gly	Gln	Gin	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
					170					175					180
Val	P	ro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
			_		185					190					195
Leu	ıI	l e	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	λrg	Tyr	Tyr	Arg
					200					205					210
He	e 1	hr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
					215	,				220	,				225
Th	r١	/al	Pro	Gly	y Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	He	Ser	Gly	Lev	Lys
					230					235					240
Pr	0	Gly	y Va	l As	р Ту	r Thr	· He	e Thi	r Val	Туі	Ala	Va	Thr	Gly	Arg
					24	5				250	)		•		255
Gl	y	As	p Se	r Pr	o Al	a Sei	r Se	r Ly	s Pr	0 11	e Se	r II	e yzı	ı Ty	r Arg
					26	0				26	5				270

Thr Glu Ile Asp

配列番号:4

配列の長さ:296 ・

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Ala lie Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro

5 10 15

Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gln	Leu	Thr
				20					25			٠		<b>30</b> .
Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met
				35				٠	40					45
Lys	Glu	ile	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser
				50	٠.				55					60
Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	V a l	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu
	•			65					70				•	75
Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	λrg	Pro	Ala	Gin	Gly	Val	Val	Thr	Thr
			•	80					85					90
Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala
				95					100					105
Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	lle	Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr
				110					115					120
lle	Thr	Gly	Phe	Gin	Val	Asp	Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Gin	Thr
			•	125	i	•			130					135
Pro	) lle	Gli	Arg	Thr	He	Lys	Pro	Asp	Vai	Arg	Ser	Tyr	Tnr	lle
				140	)			•	145				-	150
The	Gly	y Lei	u Gln	Pro	Gly	/ Thi	Asp	Туг	Lys	ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr
				155					160					165
Lei	ı Ası	n As	p Asr	Ala	Ar;	g Sei	r Sei	r Pro	Val	Val	He	e Asp	Ala	
				170					175					180
Th	r Ali	a II	e Asi	Ala	a Pr	o Se	r Ası	n Lei	ı Arg	g Phe	Le	u Ala	The	
				185	5				190	)				195

#### WO 96/17073

Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gin	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	lle
				200					205					210
Thr	Gly	Tyr	lle	lle	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg
				215					220					225
Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	l·l e
				230					235					240
Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	lle	Tyr	Val	Пe	Ala
				245					250					255
Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro	Leu	lle	Gly	Arg	Lys	Lys
				260					265					270
Thr	Asp	Glu	Leu	Pro	Gin	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu
				275	ı				280	)				285
His	s Gly	y Pr	o Glu	ille	Lei	ı Ası	Va	l Pro	Ser	Thr	•			
				290	)				295	<b>,</b>				

配列番号:5

配列の長さ:302

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn IIe Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20				,	25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40		ė			45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	۷a İ٠	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50	•				55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Va l	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gin
				65	٠				. 70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
	٠			80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100	٠				105
Thr	Val	Ĥis	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	He	Thr	Gly	Tyr	Arg
,				110	)				115					120
He	Arg	His	s His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125	5				130	) .				135
Ar	y Val	Pr	o His	Ser	Arg	, Asn	Ser	ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
.*		÷		140	)				145	5				150
Pre	Gly	Th:	r Gli	ı Tyr	. Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	\ \rz
				155	5				160	)				165
GI	u Glo	u Se	r Pri	o Lei	u Lei	ılle	Gly	Gin	Gla	n Sei	Thi	Val	Sei	Asp
				170	0				173	5				180
. Va	l Pr	o Ar	g As	p Le	u Gl	u Va	l Va	l Ala	a Ala	a Thi	r Pro	Th:	r Se	r Leu
			• . •	18					19					195

Leu lle Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg 200 205 lle Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe 220 215 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr lie Ser Gly Leu Lys 240 235 230 Pro Gly Val Asp Tyr Thr lie Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg 255 250 245 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro lie Ser lie Asn Tyr Arg 270 265 260 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr 285 275 280 Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro 300 295 290

Ser Thr

配列番号:6

配列の長さ:5

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Tyr lle Gly Ser Arg

1

5

配列番号:7

配列の長さ:283

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ιle	Glý	Pro
. 1			•	5					10					15
Asp	Thr	Met	Arg	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu
			÷	20	٠				25					30
Thr	Asn	Phe	Leu	Val	Arg	Ţyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp
				35			. •		40					45
Val	Ala	Glu	Leu	Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Va l	Leu
				50	•				55	٠				60
Thr	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val.	Val	Ser	Val	Ser	Ser
•		٠.		65				•	70	٠				75
Val	Tyr	Glu	Gin	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys
		٠		80			٠		85	,				90
Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	ile	.Thr
				95					100					105
Ala	Asn	Ser	Phe	Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle
				. 110					115	ı				120
Thi	Cly	Tyt	Arg	ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg
				125	5				130	)				135

Pro	Arg	Glu	Asp	Arg	Va l	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu
		•		140		٠			145					150
Thr	Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala
				155					160				-	165
Leu	Asn	Gly	Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser
				170					175					180
Thr	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	λsp	Leu	Glu	Val	Val	λla	Ala	Thr
				185					190					195
Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	He	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val
				200					205					210
Arg	Tyr	Tyr	Arg	ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro
				215					220					225
Val	Gin	Glu	Phe	Thr	Va I	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle
				230					235					240
Ser	Gly	Lei	ılys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala
				245	,				250	<b>;</b>				255
Vai	Thi	r Gly	y Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser
				260	)	i			265	j				270
He	e Asi	n Ty	r Ars	3 Thi	Glu	ı ile	e Asp	Lys	Pro	Ser	Cln	Met		
				27	5				280	)				

配列番号:8

配列の長さ:279

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1	-			5					10				•	15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20.	•				25	•	:	•		30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu.	Glu <sub>.</sub>	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
			:	35	٠				40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	λsp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Åsn	Leu	Leu
				50	•		* *.		55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
		٠	-	65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp.
				80					85					90
Set	Pro	The	Gly	lle	qzk	Phe	Ser	Asp	He	Thr	λla	Asn	Ser	Phe
		•		95					100					105
Th	r Val	His	s Trp	lie	λla	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
·				110	)			•	115					120
11	e Ar	g Hi	s His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
			-	125	5				130		-			135
Ar	g Va	l Pr	o Hi:	s Sei	r Arg	ı z k	n Ser	· Ile	Thr	Leu	Thr	. Yzu	Leu	Thr
				140	)	÷			145	,				150
Pr	o Gl	y Ţ'n	r Gl	u Ty	r Va	l Va	l Sei	r IIe	e Val	λla	Leu	ı Ası	Gly	Arg
				15	5				160	) .				165

Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Va l	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190				•	195
Leu	He	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	ile	Ser	Gly	Leu	Lys
				230	)				235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	λrg
				245	5				250	ı				255
G1	y Ası	Se	r Pro	o Ala	a Ser	Ser	Lys	Pro	He	Ser	· He	e Asn	Tyr	Arg
				260	0				265	j				270
Th	r Gl	u 11	e As	p Ly	s Pro	Ser	Gli	ı Met						
				27	5									

配列番号:9

配列の長さ:474

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	He	Gly	Pro
. 1				5					10					15
Asp	Thr	Met	Arg	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro.	Pro	Ser	lle	Asp	Leu
			,	20			• .		25					30
Thr	Asn	Phe	Leu	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	G l u	Asp
				35	٠.			• •	40		•			45
Val	Ala	Glu	Leu	Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu
			,	50					55	٠			·.	60
Thr	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Vai	Val	Ser	Val	Ser	Ser
				65					70					75
Va 1	Tyr	Glu	Gin	His	Glü	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys
				80					85					90
Thr	Gly	Lei	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr
				95		•			100		-			105
λla	ızkı	s Sei	Phe	Thr	Val	His	Tr	lle	λla	Pro	Arg	Ala	Thr	lle
				110	}				115	i.				120
The	Gly	у Туг	r Arg	·lle	·Arg	His	s His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg
è				125					130	) .		4.		135
Pro	) Ar	g Gli	u Asp	Arg	y Va	l Pro	o Hi	s Ser	Arg	λsπ	Ser	116	Thr	Leu
				140	)		-		145	j				150
Th	r Ası	n Le	u Thi	r Pro	Gl	y Th	r Gli	u Tyr	· Val	Val	Ser	- 116	e Val	Ala
				153	5				160	)			• • •	165
Lei	z A u	n Gl	y Ar	g . G l u	u Gl	u Se	r Pr	o Lei	ı Lev	ı Ile	e Gly	y Gli	n Glr	Ser
				170	)				175	5				180

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Th	r
185 190 19	
Pro Thr Ser Leu Leu lie Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Va	ı
200 205 21	
Arg Tyr Tyr Arg lie Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pr	0
215 220 22	
Val Gin Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr I	e
	10
Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr lle Thr Val Tyr A	l a
	55
Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro lie S	er
	70
lle Asn Tyr Arg Thr Glu lle Asp Lys Pro Ser Gln Asn Glu G	ly
	85
Leu Asn Gln Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe Asp Pro Tyr Thr V	al
	300
Ser His Tyr Ala Val Gly Asp Glu Trp Glu Arg Met Ser Glu	Ser
	315
Gly Phe Lys Leu Leu Cys Gin Cys Leu Gly Phe Gly Ser Gly	His
	330
Phe Arg Cys Asp Ser Ser Arg Trp Cys His Asp Asn Gly Val	Asn
	345
Tyr Lys Ile Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gin Gly Glu Asn Gly	Gln
350 355	360

He t	Met	Ser	Cys	Thr	Cys	Leu	Gly	Asn	Gly	Lys	Gly.	Clu	Phe	Lys
				365		•			370					375
Cys	Asp	Pro	His	Glu	Ala	Thr	Cys	Tyr	Asp	Asp	Gļy	Lys	Thr	Tyr
				380					385					390
His	Val	Gly	Glu	Gln	Trp	Gln	Lys	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ala	lle	Cys
				395					400			•		405
Ser	Cys	Thr	Cys	Phe	Gly	Gly	Cln	Arg	Gly	Trp	Arg	Cys	Asp	Asn
		.*		410.					415					420
Cys	Årg	Arg	Pro	Gly	Gly	Glu	Pro	Ser	Pro	Glu	Giy	Thr	Thr	Gly
	•			425					430					435
Gln	Ser	Ty.r	Asn	Gin	Tyr	Ser	Gln	Ärg	Tyr	His	GIn	Arg	Thr	Asn
				440				•	445	٠				450
Thr	Asn	Va I	Asn	Cys	Pro	lle	Glu	Cys	Phe	Met	Pro	Leu	Asp	Val
. •				455					460					465
Gln	Ala	Asp	Arg	Glu	Asp	Ser	Arg	Glu						
				470										

配列番号:10

配列の長さ:385

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

lla	Pro	He	Val	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Thr
1				5					10					15
ls n	Ļeu	His	Leu	Glu	Ala	Asn	Pro	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Thr	Val
				20					25					30
Ser	Trp	Glu	λrg	Ser	Thr	Thr	Pro	Asp	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg	lle
				35		,	•		40					45
Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Asn	Gly	Gin	Gln	Gly	Asn	Ser	leu	Glu	Glu
				50					55					60
۷a۱	Vai	His	Ala	a Asp	Gin	Ser	Ser	Cys	Thr	Phe	Asp	Asn	Leu	Ser
				65	5				70					75
Pro	Gly	Le	u Gli	yr Tyr	λsπ	Val	Ser	Val	Tyr	Thr	Val	Lys	Asp	Asp
				. 80	)				85	•				90
Lys	Glu	ı Se	r Va	l Pro	o lle	Ser	r Ass	Thr	. Ile	: 116	Pro	Ala	Val	Pro
				95	5				100	)				105
Pro	Pr	o Th	r As	p Le	u Arg	g Ph	e Th	r Ası	1110	e Gly	/ Pro	Asp	Thr	Met
				. 11	0				113	5				120
Ar	g Va	1 Th	r Tr	p Al	a Pr	o Pr	o Pr	o Se	r II	e As	p Lei	Thi	r Asn	Phe
				12					13					135
Le	u Va	. 1 Ar	g Ty	r Se	r Pr	o Va	l Ly	s As	n Gl	u Gl	וצא ט	p Va	l Ala	Glu
		,		14					14					150
Le	u Se	r I	le S	er Pr	o Se	r As	p As	n Al	a Va	l Va	l Le	u Th	r Ası	n Leu
				15					16					165
Le	u Pi	ro G	ly T	hr Gi	lu Ty	r Va	ıl Va	al Se	r Va	ıl Se	r Se	r Va	1 Ty	r Glu
				1	70				17	15				180

GIn	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu
			•	185		• •			190					195
Asp	Ser	Pro	Thr	G i y	He	Asp	Phe	Ser	Asp	lie	Thr	Ala	Asn	Ser
				200					205				•	210
Phe	Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr
				215					220					225
Arg	lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	λrg	Glu
				230					235		,			240
Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	λrg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	λsn	Leu
•	•			245			•		250					255
Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Vaĺ	Ser	He	Val	Ala	Leu	Asn	Gly
			٠	260					265					270
Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gin	Gin	Ser	Thr	Va!	Ser
	٠			275	•				280					285
Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	V a, I	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser
•		٠		290					295					300
Leu	Leu	He	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val.	Thr	Val	λrg	Tyr	Tyr
•				305					310					315
Arg	He	Thr	Tyr	Gly	Clu	Thr	Gly	Cly	Asn	Ser	Pro	Val	C I ņ	Glu
				320					325					330
Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Tle	Ser	Gly	Leu
				335	•				340				٠	345
Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Vai	Thr	Gly
				350					355					360

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr
365 370 375

Arg Thr Glu 11e Asp Lys Pro Ser Gln Met
380 385

配列番号:11

配列の長さ:549

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 5 15 1 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 45 40 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 60 50 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 70 75 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 90 80 85

Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95		٠			100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115				•	120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Cly	Arg	Pro	Arg	Giu	Asp
				125		•			130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
,		•		140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va i	Val	Ser	l 1 e	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
	•			155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gin	Ser	Thr	.Val	Ser	Asp
				170				•	175	٠	•*	•		180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190			٠	ē	195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	۷a۱	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Cly	λsn	Ser	Pro	_Val	Gin	Glu	Phe
	·			215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	٨·la	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230			•		235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245			·		250					255
. G I y	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala	lle Pro Ala Pro Thr Asp
275	280 285
Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro The	r Ser Leu Ser Ala Gln Trp
290	295 300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gl	y Tyr Arg Val Arg Val Thr.
305	310 315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Ly	s Glu lle Asn Leu Ala Pro
320	325 330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gl	y Leu Met Val Ala Thr Lys
335	340 345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Ly	s Asp Thr Leu Thr Ser Arg
350	355 360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Le	eu Glu Asn Val Ser Pro Pro
365	370 375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala T	hr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
380	385 390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr I	le Thr Gly Phe Gln Val Asp
395	400 405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr P	Pro lle Gln Arg Thr lle Lys
410	415 420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr ile 1	Thr Gly Leu Gln Pro Gly Th
425	430 43
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr	Leu Asn Asp Asn Ala Arg Se
440	445 45

Pro	Val	Val	lle	Asp	λla	Ser	Thr	Ala	lie	ASP	Ala	Pro	Ser
			455		:			460					465
Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	λsn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser
			470					475					480
Gin	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	lle	Thr	Gly	Tyr	I i e	lle	Lys	Tyr
			485		. :			490					495
Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Clu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg
			50.0					505					510
Gly	Val	Thr	Glu	λla	Thr	lle	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr
•		·	515	•				520					525
ı Tyr	Thr	lle	Tyr	Val	lle	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser
			530					535	•				540
u Pro	leu	He	Gly	λrg	Lys	Lys	Thr						
			545										
	Leu Gin Lys Gly	Leu Arg Gin Pro Lys Pro Gly Val	Leu Arg Phe Gin Pro Pro Lys Pro Giy Giy Vai Thr	Leu Arg Phe Leu 470 Gin Pro Pro Arg 485 Lys Pro Gly Ser 500 Gly Val Thr Glu 515 Tyr Thr lie Tyr 530 u Pro Leu Ile Gly	455 Leu Arg Phe Leu Ala 470 Gin Pro Pro Arg Ala 485 Lys Pro Gly Ser Pro 500 Gly Val Thr Glu Ala 515 Tyr Thr lie Tyr Val	455  Leu Arg Phe Leu Aia Thr 470  Gin Pro Pro Arg Ala Arg 485  Lys Pro Gly Ser Pro Pro 500  Gly Val Thr Glu Ala Thr 515  Tyr Thr lie Tyr Val lie 530  u Pro Leu lie Gly Arg Lys	455  Leu Arg Phe Leu Aia Thr Thr 470  Gin Pro Pro Arg Ala Arg lie 485  Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg 500  Gly Val Thr Glu Ala Thr lie 515  Tyr Thr lie Tyr Val lie Ala 530  u Pro Leu lie Gly Arg Lys Lys	455  Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro 470  Gin Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr 485  Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu 500  Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr 515  Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu 530  u Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr	Leu Arz Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn 470 475  Gin Pro Pro Arz Ala Arg lie Thr Gly 485 490  Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arz Glu Val 500 505  Gly Val Thr Glu Ala Thr lie Thr Gly 515 520  Tyr Thr lie Tyr Val lie Ala Leu Lys 530 535  u Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr	455 460  Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser 470 475  Gin Pro Pro Arg Ala Arg IIe Thr Gly Tyr 485 490  Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val 500 505  Gly Val Thr Glu Ala Thr IIe Thr Gly Leu 515 520  Tyr Thr IIe Tyr Val IIe Ala Leu Lys Asn 530 535  u Pro Leu IIe Gly Arg Lys Lys Thr	Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu 470 475  Gin Pro Pro Arg Ala Arg lie Thr Giy Tyr ile 485 490  Lys Pro Giy Ser Pro Pro Arg Giu Val Val Pro 500 505  Giy Val Thr Giu Ala Thr ile Thr Giy Leu Giu 515 520  Tyr Thr lie Tyr Val ile Ala Leu Lys Asn Asn 530 535  u Pro Leu ile Giy Arg Lys Lys Thr	Leu Arg Phe Leu Aia Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu 470 475  Gin Pro Pro Arg Ala Arg IIe Thr Giy Tyr IIe IIe 485 490  Lys Pro Giy Ser Pro Pro Arg Giu Vai Vai Pro Arg 500 505  Giy Vai Thr Giu Ala Thr IIe Thr Giy Leu Giu Pro 515 520  Tyr Thr IIe Tyr Vai IIe Ala Leu Lys Asn Asn Gin 530 535  u Pro Leu IIe Giy Arg Lys Lys Thr	Leu Arz Phe Leu Aia Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Vai 470 475  Gin Pro Pro Arg Ala Arg lie Thr Gly Tyr ile lie Lys 485 490  Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro 500 505  Gly Val Thr Glu Ala Thr lie Thr Gly Leu Glu Pro Gly 515 520  Tyr Thr lie Tyr Val lie Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys 530 535  u Pro Leu ile Gly Arg Lys Lys Thr

配列の長さ:422

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val	Thr	Tr	p	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	He	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
					20					25					30
Val	Arg	Ty	7 8	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Giu	Glu	Asp	Va I	λla	Glu :	Leu
					35					40					45
Ser	lle	Se	r I	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
					50					55					60
Pro	Gly	Th	r	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
					65					70					75
His	Glo	ı Se	r	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	λsp
					80					85					90
Ser	Pr	o Ti	ır.	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Äsn	Ser	Phe
					95					100					105
The	· Va	1 H	i s	Trp	lie	. Ala	Pro	) Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
					110					115					120
H	e Ar	g H	i s	His	s Pro	Gli	u Hi	s Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
					- 12	5				130	)				135
Ar	g Va	al P	ro	Hi	s Se	rλr	z As	n Se	r ile	: Th	r Lei	1 Thi	r Asr	Leu	Thr
					14	_				14					150
Pr	o C	iy 1	۲ħı	r G1	u Ty	r Va	l Va	1 Se	r II	e Va	1 A1	a Le	u Ası	ı Gly	/ Arg
					15	5				16	0				165
Gi	u G	lu :	Se	r Pr	o Le	u Le	eu II	e G1	y Gl	n Gl	n Se	r Th	r Va	l Se	r Asp
					17	70				17	5				180
V	al P	ro	Ar	g As	sp Li	eu C	lu V	al Va	l Al	a Al	a Th	r Pr	o Th	r Se	r Leu
					1	85				19	90				195

Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Аlа	Va l	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
,				200					205					210.
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Åsn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
			٠	230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Va I	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	λla	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
•	•			260					265		•			270
Thr	Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Asn	Glu	Gly	Leu	Asn	Gin
				275					280					285
Pro	Thr	Asp	) Asp	Ser	Cys	Phe	Asp	Pro	Tyr	Thr	Val	Ser	His	Tyr
				290		-			295					300
Ala	Val	Gly	y yzt	Glu	Trp	Glu	Arg	Met	Ser	Glu	Ser	Gly	Phe	
		•		305	i				310				•	315
Leu	Leu	Су	s Glr	Cys	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	His	Phe	. Arg	
			٠	320					325					330
ysı	Se !	r Se	r Ar	g Trp	Cys	s His	Asp	Asn	Cly	Val	Asn	Туг	Lys	
				335					340					345
Gl	y Gli	u Ly	s Tr	p Ası	λrs	g Gin	Gly	, Glu	Asn	Gly	Glr	n Mei	i Mei	
				350					355					360
Су	s Th	r Cy	s Le	u Gly	y As	n Gly	, Ly:	s Gly			e Ly:	s Cy:	s Asi	
				36	5				370	)				375

His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp Gly Lys Thr Tyr His Val Gly

380 385 390

Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly Ala Ile Cys Ser Cys Thr

395 400 405

Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg

410 415 420

Pro Gly

配列番号:13

配列の長さ:332

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 15 5 10 1 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu 25 20 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 45 35 40 Ser ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 55 50 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 75 70 65

His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thir	Gly	Leu	Asp
	•	•		80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
,				95		•			100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
			•	110					115				•	120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
•	•			125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	ile	Thr	Leu	Thr	Ásn	Leu	Thr
				140					145	-				150
Pro	Gly	Thr	Glu	Ţyr	Val	Val	Ser	ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Clu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Ąsp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200		•			205					210
lle	Thr	Tyr	G 1.y		Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gin	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly			Ser	Thr	Ala			Ser	Gly	Leu	
				230					235					240
Pro	Gly	Val	λsp			lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	
				245					250					255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg 265 260 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Asn Ser Asp Ser Glu Cys 285 280 275 Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys Met 300 295 290 Tyr lle Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val Val Gly 315 310 305 Tyr lie Gly Glu Arg Cys Gin Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu 330 325 320 Leu Arg 配列番号:14 配列の長さ:341 配列の型:アミノ酸 鎖の数: 1本鎖 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lie Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45

Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	Val	lsV	Leu	Thr	Asn.	Leu	Leu
•			•	50	•				55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Va l	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
		٠		80	•				85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	He	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
		:		110					1,15	•	•			120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
	,			125				•	130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	λla	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160		•			165
Glu	Glu	Sei	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gin	Gln	Ser	Thr	Vzl	Ser	
				170					175					180
۷al	Pro	Ar <sub>a</sub>	g Asp			Vai	Val	Ala			Pro	Thr	Ser	
				185					190			_	_	195
Leu	i 11)	e Se	r Trp			Pro	Ala	Val	•		Arg	Tyr	Tyr	
				200					205					210
He	? Th	r <sub>.</sub> Ty	r Gly		_	Gly	Gly	Asn			va I	Gln	Glu	
				215	)				220	)				225

Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	λsp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr	λrg
				260					255					270
Thr	Glu	He	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Gly	lle	Tyr	lle	Ser	Gly	Met
				275					280					285
Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Phe	Arg	His	Arg
			-	290					295					300
Asn	Arg	Lys	Gly	Tyr	Arg	Ser	Gln	Arg	Gly	His	Ser	Arg	Gly	Arg
				305					310					315
Asn	Gln	Asn	Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Ala	Met	Trp	Leu	Ser	Leu
				320					325					330
Phe	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ala				
				335	i				340					

配列の長さ:446

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
,1	,	,		5		•			10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Vail	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35	•		· .:		40			•		45
Ser.	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	Va l	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Gľu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					. 85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	λsπ	Ser	Phe
				95					100		•			105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
		-		110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	λrg	Pro	Arg	Glu	Asp
٠				125			•		130			÷		135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
			٠	140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	V <sub>,</sub> a l	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
			, .	155			*		160					165
Glu	Gļu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	lsV	Ser	Asp
•				170					175					180

Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val.	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	He	Ser	Trp	λsp	Ala	Pro	Ala	Va I	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gin	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Cly	Arg
				245					250					255
Gly	Ass	Sei	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	lle	λsn	Tyr	
				260					265					270
The	Gli	u H	e Asp	Lys	Pro	) Ser	Met	Val	Pro	Gly	Phe	Lys	Gly	
				275					280					285
Me	t Gl	y Le	u Lys	s Gl	ızk y	p Arg	Gly	Glu	۷al	Gly	Gln	He	Gly	
				29					295					300
Ar	g Gl	у Хх	x As	p G i	y Pr	o Glu	Gly	r Pro	Lys	Gly	Arg	Ala	Gly	
				30					310					315
Th	r Gl	y As	p Pr	o Gl	y Pr	o Sei	Gly	y Gin	Ala	Gly	Glu	Lys	Gly	
				32					325					330
Le	eu Gl	y Va	al Pr	o GI	y Le	u Pr	o Gl	у Туг	Pro	Gly	λra	Glr	Gly	
				33					34					345
Ĺ	s G	ly S	er Ti	or G!	y Pi	ie Pr	o G1	y Pho	e Pr	o Gl	y Ala	a Asi	n Gl	
				3:	50				35	5				360

Lys Gly Ala Arg Gly Val Ala Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly Gln 365 370 Arg Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Pro 380 385 Thr Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Thr Ser Gly Gly Asp Gly Pro 395 400 Pro Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Pro Gln Gly Pro Gln Gly Pro 410 415 420 Val Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Arg 425 430 435 Met Gly Cys Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly 440 445

配列番号:16

配列の長さ:457

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn He Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser He Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	λsn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
			•	95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
lle	e Ar	g His	s His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	
				125					130					135
Ars	g Va	l Pr	o His	Ser	Arg	12A S	s Sei	r He	Thr	Leu	Thr	Αsπ	Leu	
				140					145					150
Pr	o Gl	y Th	r Glu	Tyr	· Va	l Va	l Se	r He	e Val	Ala	Lei	ı Asr	Gly	
				155					160					165
G I	u Gl	u Se	r Pro	Lei	ı Le	u II	e GI	y Gl			r Thi	r Va	l Ser	
				17	0				17	5				180
۷a	al Pi	ro Ai	rg As	p Le	u Cl	u Va	l Va	1 41	a Al	a Th	r Pr	o Th	r Se	r Leu
				18	5				19	0				195
L	eu i	le S	er Tr	p As	p Al	a Pr	ro A	la Va	ıl Th	ır Va	.l Ar	z 77	r Ty	r Arg
				20	١٥				20	)5				210

ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val.	Gin	Glu	Phe
			•	215		•			220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	He	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245	•			. •	250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	ile	Ser	lle	Asn	Tyr.	Arg
,				260					265					270
Thr	Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
		,		275		•			280					285
Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	ile	Thr	ile	Ser	Trp
				290					295					300
Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	lle	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	λla	
•		*		305					310					315
Pro	Ala	ı Ası	Gly	Gin	Thr	Pro	lle	Gln		•	lle	Lys	Pro	•
				320				:	325		٠.			330
Val	l Arg	g . Sei	r Tyr			Thr	Gly	Leu	•		Gly	Thr	ASP	
				335					340					345
Ly:	s	e Ty	r Leu			r Lei	ı Asn	Asp			Arg	, Ser	Ser	
			•	350					355					360
S.V	l Va	1 11	e yzt		·	r Thi	r Ala	lle	•		Pro	Ser	Asn	
				363					370				_	375
Ar	g Ph	e Le	u Ala			r Pr	o Asi	n Ser			u Va	l Se	r Trs	
				38	0				385	5				390

Pro Pro Arg Ala Arg lie Thr Gly Tyr Ile lie Lys Tyr Glu Lys 405 400 395 Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly 420 415 410 Val Thr Glu Ala Thr lie Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr 435 425 430 Thr lie Tyr Val lie Ala Leu Lys Asn Asn Gin Lys Ser Glu Pro 450 440 445 Leu lle Gly Arg Lys Lys Thr 455

配列番号:17

配列の長さ:368

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

 Pro Thr Asp Leu Arg
 Phe Arg
 Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg

 1
 5
 10
 15

 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20
 25
 30

 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 45

er	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
			•	50		٠			55					60
ro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Vat	Ser	Val	Ser	Ser	Va I	Tyr	Glu	Gln
				65					70					. 75
lis	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80				:	85	,				90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Aso	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100		-	.:		105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	He	Thr	Gly	Tyr	Arg
			-	110					115	. •	•			120
ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Ğlu	Asp
				125				•	130				•	135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	l l e	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
			•	140	,			•	145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	V a I	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
		٠	•	155	•				160					165
Glu	Gli	. Sei	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gin	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
-				170			•	·.	175					180
Val	Pro	Arg	g Asp	Leu	Giu	Val	V a l	Ala	λla	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	116	e Se	r îrș	Asp	Ala	Pro	Ala	. Val	Thr	Val	λrg	Tyr	Tyr	Arg
	·			200	)	,			205	)				210
lie	e Th	ŗ Ťy	r Gly	y Glu	The	Cly	Gly	/ Asn	Ser	Pro	) Val	Gla	Ğlu	Phe
				215	5				220	)				225

Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	i i e	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Va l	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	He	e Asp	Lys	Pro	Ser	Mel	Ala	lle	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn
				275					280					285
Leu	γr8	Ph	e Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Ásn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp
				290					295					300
Glr	n Pro	. Pr	o Arg	g Ala	Arg	lle	Thr	Gly	Tyr	lle	. Ile	Lys	Туг	Glu
				305					310					315
Ĺу	s Pr	o G!	y Se	r Pro	Pro	) Ara	g Glu	Va	l Val	Pro	Ara	Pro	λrg	Pro
				320					325					330
GI	y Va	1 Th	r Gl	u Ala	a Th	r II	e Thi	r Gl	y Lei	u Gli	u Pr	o Gl	y Th	r Glu
				33	5				34	0				345
Тy	r Th	ır I	le Ty	r Va	1 [1	e Al	a Le	u Ly	s As	a As	n Gl	n Ĺy	s Se	r Glu
				35					35					360
Pi	ro Le	eu I	le Gi	ly Ar	g ly	s Ly	s Tn	r						
				36										

**配列の長さ:367** 

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

## 記列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp.	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
	÷			20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
٠				35					40		•		-	45
Ser	lle	Ser	Pro.	Ser	Asp	Aśn	Ala	Va l	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50				•	55				•	60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gin
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Glÿ	Leu	Asp
				80					05		· .	•		90
•				UU					85					30
Ser	Pro	Thr	Gly		Asp	Phe	Ser	λsp		Thr	Ala	Asn	Ser	
Ser	Pro	Thr	Gly		Asp	Phe	Ser	Asp		Thr	Ala	nzk	Ser	
	-		Gly	11e 95	4 4		٠.		i i e 100					Phe
	-		-	11e 95	4 4		٠.		i i e 100					Phe 105
Thr	Val	His	-	95 11e 110	Лìа	Pro	Arg	Ala	11e 100 Thr 115	lle	Thr	Gly	Tyr	Phe 105 Arg 120
Thr	Val	His	Trp	95 11e 110	Лìа	Pro	Arg	Ala Ser	11e 100 Thr 115	lle	Thr	Gly	Tyr	Phe 105 Arg 120
Thr	Val Arg	His	Trp	95 11e 110 Pro	Ala	Pro His	Arg Phe	Ala	lle 100 Thr 115 Gly 130	lle	Thr Pro	Gly	Tyr Glu	Phe 105 Arz 120 Asp 135
Thr	Val Arg	His	Trp	95 11e 110 Pro	Ala	Pro His	Arg Phe	Ala	lle 100 Thr 115 Gly 130	lle	Thr Pro	Gly	Tyr Glu	Phe 105 Arz 120 Asp 135
Thr	Val Arg	His His	Trp	95 11e 110 Pro 125 Ser 140	Ala	Pro His	Arg Phe Ser	Ala Ser	11e 100 Thr 115 Gly 130 Thr	lle	Thr Pro	Gly Arg Asn	Tyr Glu Leu	Phe 105 Arz 120 Asp 135 Thr

Glu Glu Ser Pro Leu Leu lle Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	
170 175 180	
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	
185 190 195	
Leu lie Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	<b>;</b>
200 205 210	
lie Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	3
215 220 225	
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr lle Ser Gly Leu Lys	S
230 235 24	
Pro Gly Val Asp Tyr Thr lie Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Ar	8
245 250 25	
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Ar	g
260 265 27	
Thr Glu ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Ar	.8
275 280 28	
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr lle Thr lle Ser To	r p
290 295 30	00
Arg Thr Lys Thr Glu Thr lle Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala V	a l
305 310 3	15
Pro Ala Asn Gly Gin Thr Pro lie Gin Arg Thr lie Lys Pro A	5 9
	30
Val Arg Ser Tyr Thr lie Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp T	`y (
335 340	34

Lys lie Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro 350 355 360

Val Val lie Asp Ala Ser Thr

365

配列番号:19

配列の長さ:464

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 10 1 5 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 35 40 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 50 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln 75 70 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 90 85 80

Ser Pro	Thr	Gly	lle	qzk	Phe	Ser	qzk	lle	Thr	λla	λsπ	Ser	Phe
			95					100					105
Thr Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
			110					115					120
lle Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
			125					130					135
Arg Val	Pro	His	Ser	λrg	λs'n	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
			140					145					150
Pro Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
			155	i				160	1				165
Glu Glu	Set	Pro	Lei	ı Lev	ılle	Gly	Gin	Glo	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
			170	)				175	5				180
Val Pro	Ar	g Asp	Le	u Gli	u Va	l Va	l Ala	Ala	3 Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
			18	5				190	o .				195
Leu Ile	e Se	r Tr	p As	p Al	a Pr	o Al	a Val	Th	r Val	l Arg	у Туг	r Tyl	
			20		•			20					210
lle Th	r Ty	r Gl	y Gl	u Th	r Gl	y Gl	y As	n Se	r Pr	o Va	1 G1:	n Gl	
			21					22					225
Thr Va	1 Pr	o G1	y Se	r Ly	's Se	r Th	ır Al	a Th	r II	e Se	r G I	y Le	
			23					23					240
Pro Gl	y Va	el As	p Ty	r Tl	ar I	le Ti	nr Va	l Ty	r Al	a Va	1 Th	r G1	
				45					50				253
Gly As	sp S	er Pi	ro A	la S	er S	er L	ys Pr	0 1	le Se	er II	le As	sn Ty	
			2	60				2	65				27

Thr	Glu	He	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Gly	lle	Arg	Gly	Leu	Lys	Gly
•				275	-	•			280					285
Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Asp	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Lys	Gly
				290					295					300
Asp	Met	Gly	He	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Glu	lle	Gly	Pro	Pro	Gly
				305			-		310					315
Pro	Arg	Gly	Gļu	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Arg	Gly	Gly
•	٠.			320					325					330
Pro	Asn	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly
				335					340	,				345
Lys	Leu	Gly	Val	Pro	Gly	Leu	Pro	Glý	Tyr	Pro	Gly	Arg	Gĺn	Gly
				350					355					360
Pro	Lys	Gly	Ser	lle	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Cly	Ala	Asn	Gly
				365			ŕ		370					375
Gļu	Lys	Gly	Gly	Arg	Gly	Thr	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly
			•	380	•				385					390
Gln	Arg	Gly	Pro	Thr	Gly	Pro	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Arg	Gly
				395					400					405
lie	Thr	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	4sp	Gly
				410	) · .				415					420
Pro	.Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Asn	Gly	Pro	Gin	Gly
				425				*	430					435
Pro	Thr	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly
				440	) .				445	•				450

Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Thr
455 460

配列番号:20

配列の長さ:432

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 15 10 5 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 30 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 45 40 Ser lle Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 70 His Glu Ser The Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys The Gly Leu Asp 85 80 Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr Ala Asa Ser Phe 105 100 95

Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	$\textbf{G}  \textbf{I}_j \textbf{y}$	Tyr	Arg
÷	• .		•	110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	G <sub>i</sub> l u	Asp
	,			125					130			•		135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	He	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
•				140	į				145				-	150
Pro	Cly	Thr	G <sub>1</sub> 1.u	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
	,			155					160				•	165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gin	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170	•				175		٠		÷	180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	۷a۱	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	
	٠.			185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200				. '	205					210
[]e	Thr	Туг	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Cin	Glu	Phe
				215	•				220		. ,			225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tar	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	y Va	l Asp	Tyr	Thr	lle	The	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
G 1	y As	p Se	r Pro	Ala	Sei	r Sei	r Ly:	s Pro	lle	Sei	- []:	. Ast	n Tyr	. YLS
				260					263					270
Th	r Gl	u, H	e yzi	Lys	s Pr	o Sei	r Me	t Ala	e Ala	GI	y Sei	r []	e Thi	r Thr
				27	5 ·				280	)				285

.eu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Azp	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Pro	Pro
				290					295					300
Gly	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Tyr	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly
•				305					310					315
Phe	Phe	Leu	Arg	lle	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Val	Asp	Gly	Val	Arg
				320					325					330
Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	He	Lys	Leu	Gin	Leu	Gln	Ala	Glu	Glu
				335					340					345
Arg	Gly	y Val	l Val	Ser	lle	Lys	Gly	Val	Cys	Ala	Asn	Arg	Tyr	Leu
				350					355					360
Ala	. Ne	t Ly:	s Glu	ı Ast	Gly	, Ars	g Lei	ı Lei	ı Ala	Ser	Lys	Cys	ya l	Thr
				365					370					375
Ası	p G i	u Cy	s Ph	e Pho	e Pho	e Gl	u Ar	g Le	u Gli	. Set	. yzı	n As	n Ty	r Asn
				38					38					390
Th	r Ty	r Ar	g Se	r Ar	g Ly	s Ty	r Th	r Se	r Tr	р Ту	r Va	1 Al	a le	u Lys
				39					40					405
λr	g Th	ir Gl	ly Gl	n Ty	r Ly	s Le	u Cl	y Se	r Ly	s Th	r Gl	y Pr	o G1	y Gin
				41					41					420
LY	rs A	lai	le Le	eu Pi	ne Le	eu Pi	ro Me	el Se	er Al	a Ly	s Se	er		
	•			42					43					

配列の長さ:574

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

## 配列:

Pro	Thr	A	S P	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1					5					10					15
Val	Thr	T	rp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	He	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
					20					25				-	30
Val	Arg	1	`y r	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
-					35					40			•		45
Ser	118	: 5	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Va I	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
			•		50					55					60
Pro	Gly	, 1	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Vai	Ser	Ser	Va 1	Tyr	Glu	Gln
					65	٠				70		<b>.</b>		· ·	75
His	Gi	. :	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
					80					85	. •				90
Ser	Pr	0	Thr	Gly	lle	λsp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
					95		-			100					105
Thr	٧a	l	H i s	ĩrp	ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
					110	· . I				115					120
116	. Ar	8	His	His	Pro	Gli	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
					125	<u> </u>				130	)	•			135
Ar	g Va	ı	Pro	His	Sei	. Ar	s Ası	n Sei	· He	Thr	Leu	Thr	Àsn	Leu	Thr
					140	)				145	5				150
Pr	o G I	y	Thi	r Gli	u .Ty:	r Va	l Va	l Se	r H	e 'Va	l Ala	Lei	ιλεπ	Gly	Arg
		٠.			15	5		-		16	0				165

Slu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	qzk
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leú
•				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
ile	Thi	r Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Va I	Gln	Glu	Phe
				215					220	)				225
Thr	٧a	l Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235	j				240
Pro	Gl	y Va	l Asp	Tyr	Thr	ile	Thi	Val	Ty	r Ala	a Val	Thr	Gly	Arg
				245	)				250	)				255
Gly	y As	p Se	r Pro	a Ala	Ser	Sei	Ly	s Pro	11	e Se	r ile	nzk s	Tyr	Arg
				260	)				26	5				270
Th	r Gl	lu [[	e As	p Ly:	s Pro	Se	r Ne	t Al	a II	e Pr	o Ala	a Pro	Th	r Asp
				27	5				28	0		•		285
Le	u L	ys Pt	ne Th	r Gl	n Va	l Th	r Pr	o Th	r Se	r Le	u Se	r Ala	a Gl	n Trp
				29	Ö				29	5				300
Th	ır P	ro P	ro As	n Va	l Gl	n Le	u Th	r Gl	у Ту	r Ar	g Va	l Ar	g Va	1 Thr
				30					31					315
Pı	ro L	ys G	lu Ly	s Ti	r GI	y Pr	о Ме	et Ly	rs G	lu II	le As	in Le	u Al	a Pro
			*	32						25				330
A:	sp S	er S	er S	er Va	al Va	ı Va	a 1 S	er G	ly L	eu M	et Va	al Al	a Th	ir Lys
				33	35				3	40				345

Γyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	YZĎ	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg
		•	•	350	,	ē			355					360
Pro	Ala	Gln	Gly	Vai	Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro
				365					370					375
Arg	λrg	Ala	Arg	Val.	Thr	λsp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	lle
•				380					385					390
Ser	T r.p	λrg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	ile	Thr	Gly	Phe	Gln	lsV	Asp
	•			395					400	•	•			405
Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	He	Gln	Arg	Thr	lle	Lys
		,		410					415					420
Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	lle	Thr	Giy	Leu	Gln	Pro	Gľy	Thr
			•	425					430				. •	435
Asp	Tyr	Lys	lle	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asp	λsn	Ala	Arg	Ser
				440		•			445					450
Ser	Pro	Val	Val	ile	Asp	λla	Ser	Thr	Ala	lle	Asp	slk	Pro	Ser
•	٠		-	455	•				460					465
Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	λsn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser
•				470					475					480
Trp	Gin	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	ile	Thr	Gly	Tyr	lle	lle	Ĺ7S	
				485					490					495
Glu	Lys	Pro	Cly	, Ser	Pro	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	
				500		-			505					510
Pro	Gly	sV.	l Th	r Glu	Ala	Thir	r IIe	. Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	
				515	<u>,                                      </u>				520	)				525

Glu	Tyr	Thr	He	Tyr	Val	lle	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser
				530					535					540
Glu	Pro	Leu	lle	Gly	Arg	Lys	Lys	Thr	Asp	Glu	Leu	Pro	Gln	Leu
				545					550					555
Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu	His	Gly	Pro	Glu	ile	Leu	Asp
				560					565					570
V a 1	D-0	Sar	The											

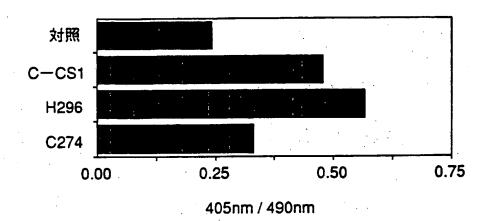
## 請求の範囲

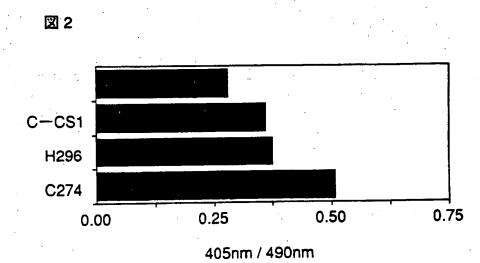
- 1. 穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法。
- 2. 培養工程が、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養する工程である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 3. 細胞接着活性物質が、細胞接着活性ポリペプチドまたは該ポリペプチドの機能的同等物である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 4. 細胞接着活性ポリペプチドが、細胞接着伸展活性ポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 5. 細胞接着伸展活性ポリペプチドが、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 6. 細胞接着活性ポリペプチドが、配列表の配列番号3、4および5で表されるポリペプチドから選択される請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 7. 細胞接着性物質がポリーN-p-ビニルベンジルーD-ラクトンアミドである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 8. 標的細胞が造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞から選択される細胞である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 9. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコード する核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞

内抗体をコードする核酸、偽 (デコイ) 遺伝子から選択される核酸である 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

- 10. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸であり、該核酸がベクターに組み込まれている請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 11. ベクターがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、 ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターから選択される ベクターである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 12. 穿孔法がエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション 法およびパーティクルガン法から選択される請求項1記載の形質転換細胞 の製造方法。
- 13. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞。
- 14.請求項1記載の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造用キット。

図 1





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02425

A. CLAS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER								
Int.	C16 C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC									
B. FIELDS SEARCHED									
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)									
Int.	C16 C12N15/87, C12N5/10, C0	)7K14/78							
			C 14abed						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched									
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS CAS ONLINE									
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT									
Category*	Citation of document, with indication, where app	ropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
A	JP, 4-063597, A (W.R. Grace February 28, 1992 (28. 02. 9 & EP, 463508, A & CA, 20443	92)	1 - 14						
A	JP, 6-090771, A (Shiseido Co April 5, 1994 (05. 04. 94)(	1 - 14							
<u></u>	er documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.							
<ul> <li>Special categories of cited documents:</li> <li>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</li> <li>"E" eartier document but published on or after the international filing date considered accument which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</li> <li>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</li> <li>"P" document published after the international filing date or prior date and not in conflict with the application but cited to understoom the principle or theory underlying the invention cannot considered novel or cannot be considered no involve an inventive at taken alone</li> <li>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot considered to involve an inventive step when the document considered to involve an inventive step when the document considered to involve an inventive step when the document considered to involve an inventive step when the document considered to involve an inventive step when the document of particular relevance; the claimed invention cannot considered to involve an inventive step when the document considered to involve an inventive step when the document of particular relevance; the claimed invention cannot considered novel or cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document of particular relevance; the claimed invention cannot considered novel or cannot be considered novel or cannot be considered novel or cannot considered novel or cannot be considered novel or c</li></ul>									
the pri	ority date claimed								
Date of the Marc	ch 1, 1996 (01. 03. 96)	Date of mailing of the international search report  March 19, 1996 (19. 03. 96)							
Name and	mailing address of the ISA/	Authorized officer							
Japanese Patent Office									
Facsimile		Telephone No.							
Laconmic	, <del></del>								

国際出職参号 PCT/JP

95/02425

•							
A. 発明の野	する分野の分類(国)	系特許分類(IPC))					
	Int. CL	C12N15/87	, C1	2N5/10.	C 0 7 K	14/78	
			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				
B. 調査を行	テった分野・						
調査を行った最	5小根資料(国際特許	分類(IPC))				·	
	Int. CL	C12N15/87	7, C1	2N5/10.	C 0 7 K	14/78	
最小限費料以外	の資料で調査を行っ	た分野に含まれるもの	٠,			·	
				* .			
国際調査で使用		ス(データベースの名称、簡			•		
	WPI, WP	I/L, BIOSIS LINE	PRE	VIEWS			
C. 関連する	ると認められる文献						
引用文献の カテゴリー*	引用文献	名 及び一部の箇所が間差	するときは、	その関連する箇所の	)表示	関連する 請求の範囲の参号	
A	アンド・カン 28.2月. &EP,46	63597, A(\$\frac{3}{2}\cdots = -2 -2) 1992(28.0) 3508, A&CA.	2. 92) 2044	3 0 7, A	<b>ノース・</b>	1-14	
<b>A</b>		90771。A(株 994(05.04.			なし)		
					. •		
C 目の統	<u> </u> きにも文献が列挙され	ている。	. 1	パテントファミ	リーに関する別組	を参照。	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による関示、使用、展示等に営及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日				「丁」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出職と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の「以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 01.03.96			国際與3	19.03.96			
1	本国特許庁(IS	SA/JP) 《関三丁目 4 番 3 号	特許庁領	F査官 (権限のある職 高 堀 栄	<b>真</b> )	B 9 2 8 1	
,	水砂工八田区政が	元二  日4世(フ	電話書4	B 03-3581-	1101 内線	3 4 4 9	

THIS PAGE BLANK (USF'1U)